

柚皮素固体脂质纳米粒冻干粉的制备及其大鼠肺部给药药动学研究

姚艳胜¹, 季 鹏², 刘 畅^{1*}, 赵文明^{2*}

1. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121000

2. 辽宁医学院药学院, 辽宁 锦州 121000

摘要: **目的** 制备柚皮素(NRG)固体脂质纳米粒冻干粉, 考察其理化性质及经大鼠肺部给药后的体内药动学行为。**方法** 采用乳化蒸发-低温固化法, 以包封率、粒径为考察指标, 正交试验优化其处方并考察其粒径、形态、电位及体外释放。以外观、色泽、再分散性为考察指标筛选最佳冻干保护剂, 采用差式扫描量热(DSC)分析药物在纳米粒中的存在状态。通过肺部给药考察 NRG 固体脂质纳米粒和 NRG 原料药溶液在大鼠体内的药动学行为。**结果** NRG 固体脂质纳米粒外观呈球形, 分布均匀, 平均粒径为 (97.69 ± 2.84) nm, 多分散系数(PDI)为 0.207 ± 0.010 , Zeta 电位为 (-26.20 ± 0.45) mV, 包封率为 $(81.09 \pm 1.37)\%$, 载药量为 $(8.30 \pm 0.04)\%$ ($n=3$), 5%甘露醇为冻干保护剂最好, 药物以无定形态分散在脂质载体中, 体外溶出实验表明 NRG 固体脂质纳米粒与原料药相比具有明显的缓释作用。NRG 原料药和纳米粒的 $C_{\max}$ 分别为 (163.00 ± 23.05) 、 (269.00 ± 35.34) ng/mL, $t_{1/2}$ 分别为 (5.13 ± 0.23) 、 (18.93 ± 7.90) h, AUC_{0-t} 分别为 (929.32 ± 190.28) 、 $(3\,390.23 \pm 533.68)$ ng·h/mL, MRT 分别为 (7.19 ± 0.44) 、 (23.29 ± 9.27) h。**结论** 乳化蒸发-低温固化法制得的 NRG 固体脂质纳米粒, 粒径小, 包封率高, 稳定性好, 工艺简单。NRG 固体脂质纳米粒肺部给药后有明显的缓释作用, 能提高药物的生物利用度。

关键词: 柚皮素; 固体脂质纳米粒; 乳化蒸发-低温固化法; 体外释放; 冷冻干燥; 药动学

中图分类号: R944.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)04-0591-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.011

Preparation of naringenin-loaded solid lipid nanoparticles lyophilized powder and its pharmacokinetics after pulmonary delivery to rats

YAO Yan-sheng¹, JI Peng², LIU Chang¹, ZHAO Wen-ming²

1. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China

2. College of Pharmacy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China

Abstract: Objective To prepare naringenin-loaded solid lipid nanoparticles (NRG-SLN) lyophilized powder, and investigate its physicochemical properties and release characteristics, then to investigate the pharmacokinetic characteristics in rats after pulmonary delivery. **Methods** NRG-SLN were prepared by solvent emulsification-evaporation method, the formulation was optimized by orthogonal design, with encapsulation efficiency as reference, and the measurements of particle size, morphology, Zeta potential, the polydispersity index (PDI) and *in vitro* drug release behavior were performed. To screen the best lyoprotectants in appearance, color, and redispersibility as indexes the differential scanning calorimetry (DSC) was used to analyze its material phase of the drug in nanoparticles. The study on pulmonary pharmacokinetics in rats was carried out by pulmonary instillation. **Results** The NRG-SLN assumed a spherical shape with an even distribution of diameter and particle size of (97.69 ± 2.84) nm, the PDI was 0.207 ± 0.010 , Zeta potential was (-26.20 ± 0.45) mV, entrapment efficiency was $(81.09 \pm 1.37)\%$, and drug loading was $(8.30 \pm 0.04)\%$ ($n=3$). Mannitol (5%) was the best protective agent for lyophilized powder of NRG-SLNs. The characterization indicated that the drug to amorphous state dispersed in a lipid. *In vitro* dissolution experiments showed NRG-SLN compared with pure drugs had obviously sustained release. After pulmonary administration to rats, the pharmacokinetic parameters of NRG-SLN and solution were as follows: $C_{\max}$

收稿日期: 2015-10-27

基金项目: 辽宁医学院校长基金-奥鸿博泽基金-医药创新专项(XZJJ20130104-02)

作者简介: 姚艳胜(1989—), 女, 硕士, 主要从事临床内分泌药物研究。E-mail: yaoyansheng.yc@163.com

*通信作者 刘 畅, 女, 教授, 主要从事临床内分泌药物方向研究。E-mail: jipeng0213@163.com

赵文明, 男, 教授, 研究方向为药物新剂型。E-mail: zhaowenming1957@163.com

(163.00 ± 23.05) and (269.00 ± 35.34) ng/mL, AUC_{0-t} (929.32 ± 190.28) and (3 390.23 ± 533.68) ng·h/mL, $t_{1/2}$ (5.13 ± 0.23) and (18.93 ± 7.90) h, MRT (7.19 ± 0.44) and (23.29 ± 9.27) h. **Conclusion** The technique of preparing NRG-SLN by solvent emulsification-evaporation has small particle size, high entrapment efficiency, and good stability, and the process is simple. Compared with the naringenin solution, the SLN show the sustained-release characteristics and can significantly improve the bioavailability after pulmonary administration.

Key words: naringenin; solid lipid nanoparticles; solvent emulsification-evaporation method; *in vitro* release; freeze drying; pharmacokinetics

柚皮素 (naringenin, NRG) 是一类天然二氢黄酮类化合物, 该类物质广泛存在于葡萄和柑橘类水果中, 现代药理学研究表明, 其具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、降低血糖等作用^[1]。NRG 是一种疏水性化合物, 口服生物利用度低 (约 5.8%), 因而制约了柚皮素的进一步推广使用^[2]。为了改善其口服生物利用度, 有研究者进行了 NRG 自微乳给药系统^[3]和新型纳米结构脂质载体^[4]等剂型的探索。

固体脂质纳米粒 (SLN) 以天然或合成的脂质作为骨架材料制成的纳米给药系统, 具有较好的生理相容性, 将药物包裹于脂质中或分散在纳米粒表面形成的新型纳米给药体系, 最大限度地避免药物与外界环境及水溶液接触。既增加了药物的稳定性, 延长了药物的半衰期, 也解决了药物水溶性差的难题, 进而提高了药物的生物利用度。同时 SLN 又具有纳米粒药物的泄露少、毒性低、操作简单等优点, 可广泛应用于大规模生产的纳米给药系统^[5]。本实验通过乳化蒸发-低温固化法制备柚皮素固体脂质纳米粒 (NRG-SLN) 冻干粉, 筛选冻干保护剂并进行质量评价。为了进一步探索 NRG 新剂型治疗急性肺损伤 (ALI) 的效果, 本实验结合疾病治疗的特点, 选择肺部给药系统进行研究, 采用气管注入方式肺部给药, 比较 NRG-SLN 和 NRG 原料药溶液在大鼠体内的药动学行为, 以探讨其肺部给药的可行性^[6]。

1 仪器与材料

JEM-1010 透射电镜, 日本电子株式会社; 2500 PC X 射线衍射仪, Rigaku Corporation; AL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; DSC-60 差示扫描量热仪, 日本岛津公司。

NRG, 质量分数 ≥ 98%, 批号 20140129, 西安瑞迪生物科技有限公司; 聚山梨酯-80 (Tween-80, 以下简称 T80, 批号 201320604), 天津市永晟精细化工有限公司; 泊洛沙姆 188 (Pluronic F68, 以下简称 F68, 批号 20140219), 天津市博迪化工股份有限公司; 无水乙醇 (分析纯); 透析袋, 截留相对

分子质量 8 000~14 000, 批号 20141108, 美国联合碳化公司; 葡聚糖凝胶 50 (Sephadex G-50), 批号 20141220, 上海蓝季科技发展有限公司。

2 方法和结果

2.1 NRG-SLN 的制备方法

采用乳化蒸发-低温固化法制备 NRG-SLN^[7]。精密量取适量 NRG、单硬脂酸甘油酯和卵磷脂溶于 6 mL 的无水乙醇中, 于 80 °C 恒温水浴锅加热使其充分溶解, 构成有机相。另取适量 F68 和 T80 溶于 18 mL 水中构成水相, 在 80 °C 条件下将有机相在 1 000 r/min 搅拌下缓慢注入水相中, 之后将得到的 NRG-SLN 混悬液于 80 °C 下持续搅拌 1~2 h 除去残留的有机溶剂并浓缩至 10 mL, 将所得乳液在 1 000 r/min 搅拌下迅速倒入 0~2 °C 的 10 mL 水中, 冷冻固化 2 h, 得到半透明带淡蓝色乳光的 NRG-SLN 混悬液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得样品, 4 °C 下保存, 备用。

空白 SLN 除不加药物外, 其他方法同上。

2.2 NRG-SLN 中 NRG 的测定

2.2.1 检测波长的选择^[8] 参考相关文献, NRG-SLN 经无水乙醇适当稀释后的最大吸收波长为 288 nm, 而此波长下空白 SLN 无干扰, 因此确定检测波长 288 nm。

2.2.2 线性关系及方法学考察 精密称取 NRG 1 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用无水乙醇稀释得 0.1 mg/mL 储备液。取该储备液适量, 用无水乙醇分别稀释成 NRG 质量浓度为 1、3、5、7、9、11 μg/mL 的对照品溶液, 并在 288 nm 处测定各溶液的吸光度 (A) 值, 以 A 值对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程: $A=0.162\ 3\ C+1.150\ 4$, $r=0.999\ 7$, 溶液在 1~11 μg/mL 内线性关系良好。

低、中、高质量浓度 (1、7、11 μg/mL) NRG 对照品溶液日内、日间精密度的 RSD 的平均值分别为 0.36%、0.47% ($n=3$); 低、中、高样品的平均回收率分别为 100.58%、101.06%、99.48% ($n=3$); 取 NRG 质量浓度为 7 μg/mL 同一供试品溶液, 分

别于1 d内每隔2 h测定1次,记录 A 值,计算NRG质量浓度的RSD为0.78%,表明供试品溶液在24 h内稳定;取NRG-SLNs样品6份,平行配制供试品溶液进行测定,连续测样6次,记录 A 值,计算NRG质量浓度的RSD为0.61%,表明该方法的重复性好。

2.3 包封率和载药量测定方法的建立

2.3.1 色谱柱的制备 选择Sephadex G-50色谱柱(20 cm×1.5 cm)分离NRG-SLN和游离NRG,取Sephadex G-50适量,置于烧杯中100℃煮3 h,在蒸馏水中放置冷却,将其缓慢倒入色谱柱中,适量蒸馏水冲洗,放置备用^[9]。

2.3.2 洗脱曲线的建立 精密吸取NRG-SLN混悬液0.5 mL上样,以蒸馏水为洗脱液,洗脱体积流量为1 mL/min,收集洗脱液1 mL/管,总共20管,分别用无水乙醇稀释至5 mL,涡旋1 min并于288 nm测定其 A 值,得到洗脱曲线(图1)。其中3~8管为有淡蓝色乳光的溶液, A 值较大,是NRG-SLN混悬液,9~12管为蒸馏水,13~17管应为洗脱下来的游离药物NRG,NRG-SLN和游离NRG分离较好。

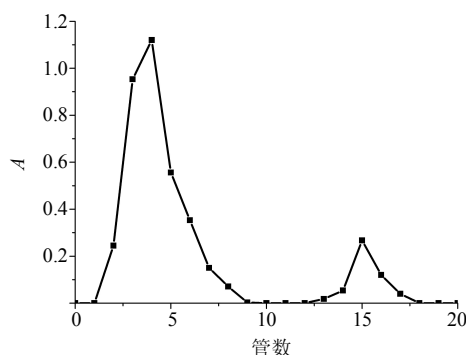


图1 NRG-SLN洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of NRG-SLN

2.3.3 包封率和载药量的测定 精密吸取0.5 mL NRG-SLN混悬液上样,以蒸馏水为洗脱液,收集带乳光的部分,无水乙醇定容至10 mL,再精密吸取1 mL,无水乙醇定容至5 mL;另精密吸取NRG-SLN混悬液0.5 mL,无水乙醇直接定容至10 mL,精密吸取1 mL,无水乙醇定容至5 mL,使用紫外分光光度仪测定2种样品,利用外标一点法测定。利用公式计算包封率及载药量:包封率= $W_{\text{包}}/W_{\text{总}}$,载药量= $W_{\text{包}}/W_{\text{脂质}}$ ($W_{\text{包}}$ 为NRG-SLN通过Sephadex G-50色谱柱的NRG量, $W_{\text{总}}$ 为NRG-SLN乙醇破乳后NRG的总量, $W_{\text{脂质}}$ 为单硬脂酸甘油酯的量,忽

视其他成分的干扰)。

2.4 单因素考察初选制备条件

在预试验的基础上按照“2.1”项下制备方法进行单因素考察。单因素考察时固定因素的具体参数为10 mg NRG、100 mg单硬脂酸甘油酯、200 mg卵磷脂、6 mL无水乙醇、100 mg F68、200 mg T80、18 mL水、80℃乳化温度,冷冻固化2 h,搅拌速率为1 000 r/min。

2.4.1 搅拌速率的选择 分别选择搅拌速率为500、1 000、1 500、2 000、2 500 r/min制备NRG-SLN,以其包封率为指标进行考察,结果1 000 r/min时效果最好。

2.4.2 乳化温度的选择 分别选择乳化温度65、70、75、80、85℃制备NRG-SLN,以其包封率为指标进行考察,结果70、75、80℃包封率结果均较好,需要进一步优化。

2.4.3 冷冻固化时间的考察 分别选择冷冻固化时间15、30、50、70、90、120 min制备NRG-SLN,以包封率为指标进行考察,在(0±2)℃的冰浴条件下,结果包封率随着冷冻固化时间延长而增大,90 min以后包封率几乎不再增加。

2.4.4 有机相(O)与水相(W)的体积比考察 分别选择有机相和水相的体积比为1:2、1:3、1:6、1:9、1:12制备NRG-SLN,以包封率为指标考察,结果1:3时包封率最高。

2.4.5 药脂比(NRG与单硬脂酸甘油酯质量比)的选择 分别选择药脂比为1:5、1:7、1:10、1:14、1:25制备NRG-SLN,以包封率为指标考察,结果差异不规则,需要进一步考察优化。

2.4.6 脂质比(单硬脂酸甘油酯与卵磷脂投料比)的选择 分别选择脂质比为1:2、3:4、1:1、5:4、2:1制备NRG-SLN,以包封率为指标考察,结果脂质比为1:2时,包封率最高。

2.4.7 F68与T80质量比的选择 分别选择F68(100 mg)与T80质量比为1:1、1:3、1:4、1:6、1:9制备NRG-SLN,以包封率为指标考察,结果1:1、1:3、1:4时包封率差异不明显,需要进一步考察优化。

2.4.8 混合表面活性剂(F68和T80)用量的选择 固定F68与T80质量比1:1,分别选择混合表面活性剂用量为0.5%、0.875%、1.25%、1.75%、2.5%制备NRG-SLN,以包封率为指标考察,结果1.25%和1.75%时包封率差异不大,需要进一步优化。

2.5 NRG-SLN 的处方优化设计

根据预试验和单因素考察, 筛选出乳化温度(A, °C), 药脂比即药物和单硬脂酸甘油酯的质量比(B), 混合表面活性剂(T80 和 F68)用量(C, %)及混合表面活性剂 F68 与 T80 质量比(D)为 4 个主要影响因素, 每个因素又选取 3 个水平, 以包封率、粒径为评价指标, $L_9(3^4)$ 正交试验法(表 1)优化 NRG-SLN 的制备工艺, 筛选最佳处方。应用加权分析法对正交试验结果进行综合分析^[7,10], 平均粒径(y_1)和包封率(y_2)分别按 55%和 45%的系数积分, 综合评分(y)= $55(1-y_1/103.9)+45 \times y_2/81.5$ 。试验设计结果见表 1, 方差分析见表 2。根据 R 值大小 $D > C > B > A$, 参考各因素的结果, 得出最佳处方为 $A_3B_2C_2D_2$, 即药脂比 1:10, 温度 80 °C, F68-T80 (1:2), 混合表面活性剂用量为 1.5%。

2.6 验证试验

以最佳处方制备 3 批 NRG-SLN, 测定包封率

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/°C	B	C/%	D	y_1/nm	$y_2/\%$	y
1	70 (1)	1:5 (1)	1.0 (1)	1:1 (1)	85.55	52.5	37.93
2	70 (1)	1:10 (2)	1.5 (2)	1:2 (2)	63.03	62.5	56.67
3	70 (1)	1:15 (3)	2.0 (3)	1:4 (3)	87.58	41.3	31.66
4	75 (2)	1:5 (1)	1.5 (2)	1:4 (3)	103.8	81.2	44.87
5	75 (2)	1:10 (2)	2.0 (3)	1:1 (1)	64.33	67.4	56.01
6	75 (2)	1:15 (3)	1.0 (1)	1:2 (2)	102.9	72.5	40.18
7	80 (3)	1:5 (1)	2.0 (3)	1:2 (2)	77.78	81.8	59.02
8	80 (3)	1:10 (2)	1.0 (1)	1:4 (3)	106.4	69.3	36.12
9	80 (3)	1:15 (3)	1.5 (2)	1:1 (1)	89.65	82.9	54.09
K_1	126.26	141.82	114.23	148.03			
K_2	141.06	148.80	155.63	155.87			
K_3	149.23	125.93	146.69	112.65			
R	22.97	22.87	41.40	43.22			

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
B	91.583	2	1.013	无
C	316.393	2	3.501	无
D	353.464	2	3.911	无
A(误差)	90.379	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$$

及载药量。样品的包封率分别为 82.22%、81.89%、79.16%, 其平均值为 $(81.09 \pm 1.37)\%$, 载药量分别为 8.31%、8.27%、8.32%, 其平均值为 $(8.30 \pm 0.04)\%$, 表明本实验方法制备的 NRG-SLN 包封率较高, 载药量较大。用蒸馏水适当稀释 NEG-SLN 混悬液, 滴于铜网上, 2%磷钨酸染色, 空气中自然晾干, 在透射电镜下观测纳米粒的形态(图 2), 呈球形及类球形实心粒子。另取 NEG-SLN 混悬液, 蒸馏水稀释 20 倍, 激光粒度仪测定粒径(图 3-A)及 Zeta 电位(图 3-B)。本方法制备的纳米粒大小分布比较均匀, 3 批样品的粒径分别为 94.81、96.71、101.55 nm, 其平均值为 (97.69 ± 2.84) nm; PDI 分别为 0.218、0.207、0.198, 其平均值为 0.207 ± 0.010 ; Zeta 电位分别为 -25.6、-26.7、-26.3 mV, 其平均值为 (-26.20 ± 0.45) mV。

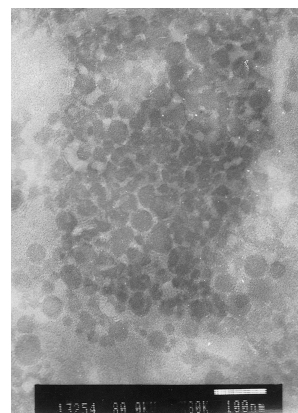


图 2 NRG-SLN 的透射电镜图

Fig. 2 Transmission electron microscope of NRG-SLN

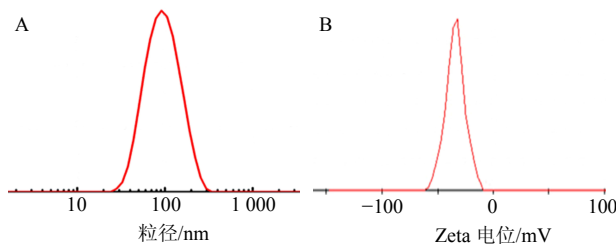


图 3 NRG-SLN 的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位图 (B)

Fig. 3 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of NRG-SLN

2.7 体外释药实验^[11]

分别取 2 mL NRG-SLN 混悬液(含 2 mg NRG)和 2 mL NRG 溶液(1 mg/mL 的乙醇溶液)置透析袋中, 扎紧两端, 置锥形瓶, 释放介质为含 0.5% T80 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4), 释放体积为 50 mL, 转速为 150 r/min, 温度为 (37.0 ± 0.5) °C 进行试验。在预定的时间点 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、

6.0、8.0、12.0、24.0、36.0 h 取样 0.5 mL，同时补充等体积同温的释放介质。根据“2.2”项下方法采用外标一点法测量并计算各时间点 NRG 的释放量，以累积释放率为纵坐标，取样时间为横坐标绘制释放曲线（图 4）。NRG 溶液在 6 h 的累积释放率达到了 90%以上，而 NRG-SLN 混悬液约 50%，24 h 达到了 80%。从结果中分析得出，固体脂质纳米粒载药系统可以延长药物的释放，达到缓释效果。

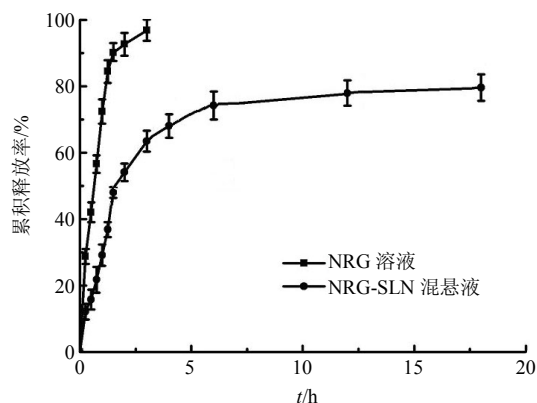


图 4 NRG 溶液与 NRG-SLN 混悬液的体外药物释放曲线 ($n = 3$)

Fig. 4 *In vitro* release of NRG solution and NRG-SLN ($n = 3$)

2.8 NRG-SLN 冻干粉的优化制备^[10,12]

分别加入 2%、5%、10% 的冻干保护剂（乳糖、甘露醇、蔗糖）于 NRG-SLN 混悬液中，涡旋混匀，分别移取 2 mL 于西林瓶中， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻 24 h 后，冷冻干燥即可，得到淡白色疏松冻干粉，以外观、色泽、再分散性为考察指标，评分标准见表 3。实验结果（表 4）表明，以 5% 甘露醇为冻干保护剂效果最好，得到的冻干粉外形饱满，色泽均匀，再分散性好。

2.9 NRG-SLN 冻干粉的质量考察^[12]

5% 甘露醇为冻干保护剂制得的冻干粉，测得休止角为 35° ，流动性较好，量筒法测得冻干粉堆密度为 0.3 g/mL 。将冻干粉置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，30 d 后取样观察，冻干粉外观仍为淡白色，表面光滑平整，未见

表 3 指标评分标准

Table 3 Score standard of indexes

评分	外观	色泽	再分散性
0~2	皱缩多孔	分层，上下色差明显	$>90\text{ s}$
3~5	皱缩多孔	分层，上下色差不明显	$60\sim90\text{ s}$
6~8	皱缩多孔	上下色差不明显	$30\sim60\text{ s}$
9~10	致密饱满	均匀无色差	$<30\text{ s}$

表 4 冻干保护剂的筛选

Table 4 Screening of lyophilized protective agents

试验号	冻干保护剂用量/%			得分			总得分
	乳糖	甘露醇	蔗糖	外观	色泽	再分散性	
1	2	—	—	5	6	7	18
2	5	—	—	7	7	7	21
3	10	—	—	8	8	6	22
4	—	2	—	9	7	7	23
5	—	5	—	9	10	9	28
6	—	10	—	8	8	7	23
7	—	—	2	3	5	6	14
8	—	—	5	4	6	7	17
9	—	—	10	5	7	7	19

明显变化，加入适量蒸馏水复溶后，混悬液为淡蓝色带有乳光，再分散性好，测得平均粒径、Zeta 电位、包封率分别为 $(111.5\pm14.5)\text{ nm}$ ， $(-20.5\pm1.2)\text{ mV}$ ， $(79.2\pm3.1)\%$ 。可见，5% 甘露醇为冻干保护剂，冻干粉的稳定性较好， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下可长期贮存，有利于大规模生产应用。

2.10 NRG-SLN 冻干粉的理化性质研究

将 NRG、空白 SLN 冻干粉、NRG 与空白 SLN 物理混合物、NRG-SLN 冻干粉进行 DSC 分析，氧化铝 (Al_2O_3) 为参比物，升温范围 $18\sim285\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，以 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升温扫描，以 NRG、空白 SLN 冻干粉，处方比例的物理混合物，NRG-SLN 冻干粉为样品，分析结果见图 5。NRG 原料药和物理混合物在 $168\text{ }^{\circ}\text{C}$ 都有吸收峰，而 NRG-SLN 冻干粉在 $168\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的吸收峰消失，说明 NRG 以无定形态存在 SLN 载体中。

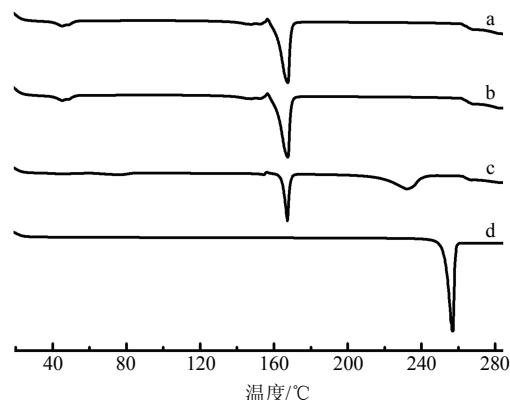


图 5 NRG-SLN (a)、blank-SLN (b)、NRG 与空白 SLN 物理混合物 (c) 和 NRG (d) 的 DSC 图

Fig. 5 DSC analysis on NRG-SLN (a), blank-SLN (b), physical mixture of NRG and blank-SLN (c) and NRG (d)

2.11 大鼠肺部给药药动学研究

2.11.1 给药方法及样品采集^[13] 取健康的 SD 大鼠 12 只, 随机分成 2 组, 实验过程中严格遵守动物伦理委员会的规定。实验前禁食至少 12 h, 自由饮水, 按照 4 mg/mL NRG 质量浓度配置 NRG-SLN 混悬液(冻干粉用双蒸水复溶, 临用现配)和 NRG 原料药(分散在 0.5% 羧甲基纤维素溶液中, 临用现配)进行肺部给药。肺部给药方法为注射器气管注入, 给药前用 0.3% 戊巴比妥钠(10 mL/kg)腹腔注射麻醉。然后将大鼠固定在一倾斜约 80° 的木板上, 大鼠自主呼吸, 用喉镜使大鼠开口, 镊子轻轻拉出舌头, 慢慢将通气导管一端插入大鼠气管, 预先装好样品的注射器(含 NRG 4 mg, 1 mL 溶液)连接导管另一端并注入肺部, 给药后维持鼠板倾斜 80° 1 min, 再呈水平放置。按剂量 20 mg/kg 给药后, 分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 眼眶取血 0.5 mL, 置于加有肝素钠的离心管中, 8 000 r/min 离心 15 min, 分离血浆, 置 -20 °C 冰箱中储存待分析。

2.11.2 大鼠血浆中 NRG 定量测定方法及血浆样品处理^[2] 通过高效液相测定大鼠血浆中 NRG 的质量浓度, 测定条件: 色谱柱为 Hypersil BDS-C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(7:3); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 289 nm; 进样量为 20 μL; 柱温 30 °C。

取 200 μL 血样, 加入 2% 甲酸 50 μL, 涡旋 2 min, 再加入 1.2 mL 醋酸乙酯萃取血样, 涡旋 5 min。12 000 r/min 离心 10 min, 上清液转移至离心管中, 置真空离心浓缩干燥机挥干, 残留物用 50 μL 流动相复溶, 涡旋 5 min, 上层有机层被转移到新的 EP 管, 40 °C、34.475 kPa (5 psi) 氮气压下浓缩。150 μL 流动相(甲醇-水 7:3)复溶, 取 20 μL, 进样。在该色谱条件下, 最低检测限为 1 ng/mL (信噪比为 3:1), NRG 的保留时间为 (4.500±0.105) min, 峰形良好, 血浆对柚皮素的测定无干扰, NRG 在 125~50 000 ng/mL 线性关系良好, 以待测物质量浓度为横坐标 (C), 峰面积为纵坐标 (A), 得到标准曲线方程 $A=63.69 C+26\ 803.05$, $r=0.999\ 67$ 。

分别配制低、中、高质量浓度 (500、10 000、50 000 ng/mL) 的 NRG 空白血浆标准溶液, 按血浆样品的处理方法操作, 计算回收率, 测定日内与日间 (3 d 内) 精密度。结果低、中、高 3 个质量浓度样品的平均回收率分别为 103.25%、99.40%、

101.25%, 日内精密度 RSD 值分别为 3.11%、2.63%、2.53% ($n=3$), 日间精密度的 RSD 值分别为 3.30%、3.92%、4.12% ($n=3$)。该方法符合体内生物样品测定要求。

2.11.3 血浆样品测定结果 按照“2.11.2”项方法进样, 计算血浆样品中的药物浓度, 绘制药物浓度-时间曲线(图 6)。药动学参数的求算以及处理大鼠血浆药物浓度数据均采用 PK Solver 2.0 软件进行处理^[14], 求得各药动学参数并对各给药组的主要药动学参数用 SPSS 18.0 软件进行独立样本 t 检验, $P<0.05$ 有统计学意义(表 5)。NRG-SLN 肺部给药的相对生物利用度 ($AUC_{0-\infty}$) 远远高于 NRG 原料药, 提高了约 2.47 倍 ($P<0.05$)。

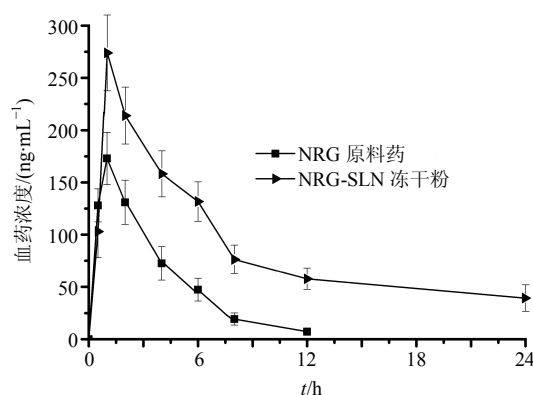


图 6 NRG 原料药和 NRG-SLN 冻干粉肺部注入后药物在大鼠体内的平均药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 Concentration-time curve for NRG suspension and NRG-SLN ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 5 NRG 原料药和 NRG-SLN 冻干粉的主要药动学参数 ($n=6$)

Table 5 Pharmacokinetic parameters of NRG suspension and NRG-SLN ($n=6$)

参数	单位	NRG	NRG-SLN
$t_{1/2}$	h	5.13 ± 0.23	18.93 ± 7.90^b
C_{max}	ng·mL ⁻¹	163.00 ± 23.05	269.00 ± 35.34
AUC_{0-24h}	ng·h·mL ⁻¹	854.65 ± 170.37	$2\ 114.40 \pm 301.48$
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	929.32 ± 190.28	$3\ 390.23 \pm 533.68^b$
MRT	h	7.19 ± 0.44	23.29 ± 9.27^b
CL	mL·h ⁻¹	$4\ 306.92 \pm 930.31$	$1\ 284.94 \pm 179.83^b$
t_{max}	h	1	1
相对利用率 ^a %	—	—	2.47 ± 1.77

^a 以 NRG 溶液为参考, 基于 $AUC_{0-\infty}$ 的数值计算; ^b 表明 $P<0.05$, 两组间有统计学意义

^a calculated based on $AUC_{0-\infty}$ with the NRG as reference; ^b $P<0.05$, statistically significant difference in comparison with NRG

3 讨论

本实验在预试验的基础上,以包封率、平均粒径大小为考察指标,正交试验法优化处方制备优化,结果发现以单种表面活性剂制备的 NRG-SLN 分散性不好,粒径较大,有絮状物的出现,呈乳白色,而以 T80 和 F68 组成的混合表面活性剂成型性好,稳定性高。

SLN 有很多的制备方法,高压均质法是工业化、大规模生产的主要方法,制得的纳米粒粒径均匀性较好,但对设备的要求较高;薄膜-超声分散法制备过程容易控制,但制备过程中可产生微米级粒子,易产生金属污染,且成膜不均匀;溶剂注入法操作简单,不需要加热,但是制备中通常需要使用有机溶剂,导致残留的溶剂不易除去,潜在毒性较大。本研究采用乳化蒸发-低温固化法^[4]制备 NRG-SLN,具有制备设备简单,成本较低,制备出的纳米粒粒度分散较均匀,尤其适合实验室小规模研究使用。本实验考虑到单硬脂酸甘油酯的熔点为 70~80℃,乙醇的沸点为 78.3℃,乳化温度应有利于乳化,且有机溶剂易挥发完全,最终确定乳化温度为 80℃。表面活性剂的使用不但降低了乳液的表面张力,而且增加了药物在脂质中的溶解度,单一表面活性剂时,在乳化过程中乳化不彻底,包封率较低且稳定性不高;而混合表面活性剂的使用,可显著提高包封有效降低了粒径,减少纳米粒的聚集,大大增加了药物的溶解度和稳定性^[15]。

载药纳米粒和游离药物的分离是测定包封率和载药量的关键,本实验曾考虑采用超速离心法,以 18 000 r/min 离心 30 min 后仍未见分层,其原因可能是 SLN 粒径比较小,脂质材料相对密度比较接近。透析法单个样品在室温条件下的处理时间约 24 h,比较耗时;超滤法和葡聚糖凝胶柱法成本较高;而葡聚糖凝胶色谱柱法能将不易进入凝胶内部的固体脂质纳米粒大分子先洗脱下来,易进入凝胶内部的小分子游离药物后洗脱下来而达到分离,且该法重现性好、快速有效、成本低,故本实验选择葡聚糖凝胶色谱柱法测定包封率^[14]。

低温冷冻固化时,必须降温迅速,否则易导致纳米粒具有一定的软黏性,易粘连,粒径增大且易沉降,稳定性不好。搅拌速率也是影响粒径的重要因素,过低时粒径具有增大的趋势,稳定性较差;过快则易产生较多泡沫,易外溅,影响了表面活性剂的乳化效果,本实验采取 1 000 r/min 较为适宜^[16]。

根据双分子层理论,Zeta 电位的大小与纳米粒体系的稳定性密切相关,Zeta 电位在-20~-35 mV 内,纳米粒相对较为稳定。本实验所制 NRG-SLN 的平均 Zeta 电位为 (-26.20 ± 0.45) mV,负电荷,斥力较强,稳定性较好。加入冻干保护剂后,冷冻干燥,可以阻止与纳米粒的直接接触,纳米粒不容易破裂,药物及脂质的氧化、水解速度降低,外层的表面活性剂与冷冻保护剂分子间发生氢键缔合,起到了“伪水化层”的作用,与水形成了低共融物或玻璃状物质,抑制了晶型的生长,使冰晶以微晶或无定型形态存在,降低其对纳米粒的挤压和机械损伤作用,可防止冻干过程中粒子的聚集,有效地抑制了药物的泄漏^[17]。

与 NRG 原料药相比,NRG-SLN 的 $t_{1/2}$ 延长,其原因可能是药物被包封在脂质载体中,有效地减缓了药物释放; $C_{\max}$ 和 AUC_{0-t} 值分别为原料药的 1.65 倍和 3.648 倍,表明 NRG-SLN 能够显著提高肺部给药药物的生物利用度,其原因可能是 NRG 是含有酚羟基的黄酮类化合物,水溶性差,不易透过组织生物膜屏障,肺部的吸收率较低,而 NRG-SLN 将药物包埋在脂质载体材料中,一方面提高了体内的稳定性,增强其脂溶性,与肺泡表面更好融合,有助于 SLN 通过肺泡壁进入毛细血管,使其有效的血药浓度时间延长;另一方面可使 NRG 在体内具有缓释性能,从而延长药物在系统循环中的滞留时间,有利于提高肺部给药药物的生物利用度。此外,制剂中的表面活性剂,如 T80 和卵磷脂,有助于增加肺泡壁的渗透性或改进的脂质颗粒和肺泡壁之间的亲和性,表现出较好的生物黏附性;NRG 嵌入固体脂质矩阵,可以减少与细菌接触以及吸收过程中的酶降解,减少药物的降解和清除。

由图 4 可知,游离的 NRG 溶液在 6 h 内累积释放率大于 90%,而 NRG-SLN 释放了约 50%,之后持续缓慢释放至 24 h 达到了 80%。SLN 起始时释放较快的原因可能是 SLN 外表面的有一定量的药物快速释放和较小的颗粒具有较大的比表面积而增加初始药物的释放速率。SLN 通常有 3 种包封药物模型:(1)固溶体模型;(2)核-壳模型,药物丰富的壳中;(3)核-壳模型,药物丰富的核心。本实验制备的 NRG-SLN 最符合核-壳模型。

至今国内外仍无 NRG 制剂用于临床,而纳米载药系统具有很好的应用前景,SLN 具有良好的肺部耐受性,但不稳定、药物易泄漏,如果将其制备

成冻干粉吸入剂,不仅可以提高其稳定性,而且使用方便。本实验为NRG-SLN肺部给药系统的进一步研究提供了理论依据和实验基础。

参考文献

- [1] 季鹏, 赵文明, 于桐. 柚皮素的最新研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(12): 1382-1387.
- [2] Khan A W, Kotta S, Ansari S H, *et al.* Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(5): 772-779.
- [3] 王章姐, 胡容峰, 王国凯, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优化柚皮素自微乳给药系统 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2461-2466.
- [4] 李静静, 贾运涛, 田睿, 等. 柚皮素纳米结构脂质载体的处方优化和初步评价 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 211-215.
- [5] Ren J G, Zou M J, Gao P, *et al.* Tissue distribution of borneol-modified ganciclovir-loaded solid lipid nanoparticles in mice after intravenous administration [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 83(2): 141-148.
- [6] 张天柱, 马春华, 樊湘泽. 柚皮素对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(6): 29-31.
- [7] 于桐, 吴超, 季鹏, 等. 黄芩素固体脂质纳米粒冻干粉的制备及体外释药性质的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2720-2727.
- [8] 季鹏, 赵文明. 柚皮素固体脂质纳米粒的制备及体内外初步评价 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(18): 2147-2152.
- [9] 夏爱晓, 宋倩倩, 孙渊, 等. 硫酸长春新碱固体脂质纳米粒的制备及其性质考察 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(2): 163-169.
- [10] 张晓娟. 淫羊藿苷隐形固体脂质纳米粒冻干粉制备及质量控制 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(9): 732-734.
- [11] Parveen R, Ahmad F J, Iqbal Z, *et al.* Solid lipid nanoparticles of anticancer drug andrographolide: formulation, *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40(9): 1206-1212.
- [12] 季鹏, 赵文明. 柚皮素脂质体冻干粉的制备及其药效学评价 [J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(2): 208-214.
- [13] Yang X Y, Liu Y J, Liu C X, *et al.* Biodegradable solid lipid nanoparticle flocculates for pulmonary delivery of insulin [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2012, 8(5): 834-842.
- [14] 季鹏, 赵文明. 柚皮素脂质体的制备及大鼠肺部给药药动学研究 [J]. 中成药, 2015, 37(8): 1699-1704.
- [15] Jose S, Anju S S, Cinu T A, *et al.* *In vivo* pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery [J]. *Int J Pharm*, 2014, 474(1/2): 6-13.
- [16] Zhang Y, Huo M R, Zhou J P, *et al.* PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel [J]. *Comput Methods Programs Biomed*, 2010, 99(3): 306-314.
- [17] Fan Y P, Liu J G, Wang D Y, *et al.* The preparation optimization and immune effect of epimedium polysaccharide-propolis flavone liposome [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 94(1): 24-30.